

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/064784 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/12,  
15/81, 1/18, C07K 14/62, C12Q 1/02, 1/54 // (C12N 1/18,  
C12R 1:865)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01373

(22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Februar 2002 (09.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 06 718.6 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND  
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt  
(DE).

(72) Erfinder: MÜLLER, Günter; Im Haindell 1b, 65843  
Sulzbach a. Ts. (DE). KOLLER, Klaus-Peter; Carl-  
Orff-Weg 12, 65812 Bad Soden (DE). BOLES, Eckhard;  
Röntgenweg 5, 40591 Düsseldorf (DE). WIECZORKE,  
Roman; Frankenstrasse 13, 40476 Düsseldorf (DE). DLU-  
GAI, Silke; Burscheiderstr. 40, 40591 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: YEAST STRAIN OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH FUNCTIONAL EXPRESSION OF A GLUT TRANS-  
PORTER

(54) Bezeichnung: HEFESTAMM VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MIT FUNKTIONELLER EXPRESSION EINES  
GLUT-TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention relates to a yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* which, due to deletion of the genomic sequences,  
does not produce any hexose transporters and which as a consequence cannot propagate on substrates that have hexose as the only  
carbon source. The capability of the strain of propagating on substrates that have hexose as the only carbon source can be re-estab-  
lished by expression of a GLUT4 gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher durch Deletion der ge-  
nomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger  
Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hoxose als einziger Koh-  
lenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

WO 02/064784 A2

## Beschreibung

Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit funktioneller Expression eines Glut-  
5 Transporters

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger  
10 Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

Die meisten heterotrophen Zellen transportieren Glukose über spezielle  
15 Transporterproteine ins Zellinnere. Bei den verschiedenen Organismen haben sich unterschiedliche Mechanismen herausgebildet, die den Glukosetransport vermitteln, also Protonen-Symportsysteme, Na<sup>+</sup>-Glukosecotransporter, bindungsproteinabhängige Systeme, Phosphotransferasesysteme sowie Systeme für die erleichterte Diffusion. Bei den Eukaryonten vermittelt eine Familie von  
20 Glukosetransportern, die bei Säugetieren von den GLUT-Genen und bei *Saccharomyces cerevisiae* von den HXT-Genen codiert werden, die Glukoseaufnahme über erleichterte Diffusion. Diese Transporter zählen zu einer größeren Zuckertransport-Superfamilie und sind durch das Vorliegen 12 transmembranöser Helices und mehrerer konservierter Aminosäurereste und –  
25 motive gekennzeichnet.

Der Glukosetransport bei Säugetieren war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, da die Kenntnis der Vorgänge bei Krankheiten, die mit einer defekten Glukosehomöostase assoziiert sind, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder Fanconi-Bickel-Syndrom, von großer Wichtigkeit ist. Bis zum gegenwärtigen  
30 Zeitpunkt sind acht Glukosetransporter (GLUT1 bis GLUT5, GLUT8, GLUT9/SLC2A9, GLUT9 (GenBank Aufnahme-Nr. Y17803)) identifiziert worden, welche zur erleichterten Glukoseaufnahme beitragen. Zu den Schlüsselrollen dieser Transporter zählen die Aufnahme von Glukose in verschiedene Gewebe, ihre

Speicherung in der Leber, ihre insulinabhängige Aufnahme in die Muskelzellen und Adipozyten sowie die Glukose-Messung durch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

GLUT1 vermittelt den Glukosetransport in die Erythrozyten und durch die Blut-Hirn-Schranke, wird jedoch auch in vielen anderen Geweben exprimiert, während GLUT4

auf insulinabhängige Gewebe, in erster Linie auf Muskel- und Fettgewebe

beschränkt ist. Bei diesen insulinabhängigen Geweben stellt die Kontrolle des

Targeting von GLUT4-Transportern in intrazelluläre Kompartimente oder

Plasmamembrankompartimente einen wichtigen Mechanismus für die Regulierung

der Glukoseaufnahme dar. In Gegenwart von Insulin wird intrazelluläres GLUT4 auf

die Plasmamembran zurückverteilt, um die Glukoseaufnahme zu erleichtern. GLUT1

wird in diesen insulinabhängigen Geweben ebenfalls exprimiert, und seine

Verteilung in der Zelle wird ebenfalls von Insulin beeinflusst, jedoch weniger stark.

Darüberhinaus wird die relative Wirksamkeit, mit der GLUT1 oder GLUT4 den

Zuckertransport katalysieren, nicht nur von dem Ausmaß des Targetings jedes

Transporters an die Zelloberfläche bestimmt, sondern auch von ihren kinetischen Eigenschaften.

Die Tatsache, daß unterschiedliche Glukosetransporter-Isoformen koexprimiert

werden sowie der rasche Glukosemetabolismus hat Untersuchungen bezüglich der

Rolle und der genauen Eigenschaften jeder Glukosetransporter-Isoform in diesen

insulinabhängigen Geweben kompliziert gestaltet. Um diese Probleme zu lösen,

wurden heterologe Expressionssysteme wie *Xenopus*-Oozyten, Gewebekulturzellen,

Insektenzellen und Hefezellen verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, daß

Schwierigkeiten bei diesen Systemen auftraten: zu schwache Aktivität der heterolog

exprimierten Transporter, eigene Glukosetransporter bei diesen Systemen, die

intrazelluläre Retention eines beträchtlichen Teils der Transporter, oder sogar die

Produktion inaktiver Transporter.

Bislang ist noch kein Organismus bekannt, der außer einem heterologen und

funktionellen Glut4-Glukosetransportprotein kein weiteres insbesondere

intrinsisches Hexosetransportprotein exprimiert. Dies führt zu einer Reihe von

Nachteilen bei der Suche nach Verbindungen, welche die Transporteigenschaften

des Glut4-Proteins verändern können. Solche Verbindungen wären von großem

Interesse als Bestandteile von Arzneimitteln, da bekannt ist, daß Glut4 bei der

Absenkung der Blutglukosekonzentration im Zusammenspiel mit Insulin und anderen Faktoren eine wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe eines Organismus, der ein funktionelles Glut4-Transportprotein exprimiert, hätte man die Möglichkeit nach Verbindungen zu suchen, die den Glut4-Transporter direkt beeinflussen. Die Nebenwirkungen solcher  
5 Verbindungen wären geringer, da keine Nebeneffekte vermittelt über Signalfaktoren auftreten würden. Außerdem wären die Handhabung und Bereitstellung des Materials im Falle eines zur Verfügung stehenden Hefestammes sehr erleichtert. Als Aufgabe der Erfindung wird deshalb die Bereitstellung eines Hefestammes angesehen, der ein funktionelles Glut4-Protein exprimiert.

10

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein  
15 GLUT4-Gen zur Expression bringt. Solch ein Stamm kann beispielsweise durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen hergestellt werden. Hexosen soll als Bezeichnung für Aldosen mit 6 Kohlenstoffatomen wie Glukose, Galaktose oder Mannose sowie für Ketosen mit 6 Kohlenstoffatomen wie Fruktose oder Sorbose verwendet werden.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wie eben beschrieben, wobei dieser Stamm ein GLUT4-Gen enthält.

25

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich drei Maltosetransporter bekannt, die, sofern sie stark genug exprimiert werden, in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem durch Deletion sämtliche Transporter, die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Dieser Stamm enthält lediglich noch die beiden Gene MPH2 und MPH3, die zu Maltosetransportproteinen homolog sind. Die beiden Gene MPH2 und  
30 MPH3 werden bei Anwesenheit von Glukose im Medium reprimiert. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit einer Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Aus diesem Stamm können Mutanten selektiert werden, die ausgehend von einem

entsprechenden Vektor Glut1 funktionell exprimieren (Stamm hxt fgy1-1).

Transformiert man in den Hefestamm hxt fgy1-1 einen Plasmidvektor, welcher ein GLUT4-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch nur sehr wenig Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von Glut4 erfordert weitere

- 5 Anpassungen dieses Hefestammes, um einen signifikanten Glukosetransport mittels Glut4 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen Glukosetransporters Glut4 in die Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm hxt fgy1-1 der ein Glut4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt,
- 10 transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem Nährmedium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält, und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30°C beobachtet man Wachstum von vereinzelt Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die
- 15 Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Wird diesem Stamm, der nun kein Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Die
- 20 Herstellung eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae*, welcher die Glukoseaufnahme mittels eines Glut4-Transporters ermöglicht, wird in den Beispielen ausführlich beschrieben. Dieser Stamm exprimiert keine hefeeigenen Transporter für Hexosen und ist in der Lage mittels eines beispielsweise durch Transformation eingeführten Gens für einen Glut4-Transporter Hexosen
- 25 insbesondere Glukose in die Zelle aufzunehmen. Hefestämme mit dieser Eigenschaft wurden unter der Nummer DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ) in Braunschweig gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von
- 30 Patentverfahren hinterlegt (Tabelle 1).

In einer bevorzugten Ausführungsform des Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung wird ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines

Expressionspromotors für Hefen zur Expression gebracht. Geeignete

Expressionspromotoren der Hefe sind dem Fachmann bekannt. Solche sind beispielsweise der SOD1-Promotor (Superoxiddismutase), ADH-Promotor (Alkoholdehydrogenase), der Promotor für das Gen der sauren Phosphatase, HXT2-Promotor (Glukosetransporter 2), HXT7-Promotor (Glukosetransporter 7), GAL2-Promotor (Galaktosetransporter) und andere. Das Konstrukt bestehend aus einem Expressionspromotor einer Hefe und einem GLUT4-Gen ist für den Zweck der Expression Bestandteil eines Hefevektors. Dieser Hefevektor kann zur Durchführung der Expression als selbstreplizierendes Partikel unabhängig vom Genom der Hefe vorliegen oder stabil in das Genom der Hefe integriert sein. Als Hefevektor eignet sich grundsätzlich jede Polynukleotidsequenz, welche in einer Hefe vermehrt werden kann. Als Hefevektoren können insbesondere Hefepasmide oder künstliche Hefechromosomen (Yeast Artificial Chromosomes) verwendet werden. Hefevektoren enthalten in der Regel einen „origin of replication“ (2 $\mu$ , ars) für die Einleitung der Replikation sowie einen Selektionsmarker, der üblicherweise aus einem Auxotrophiemarker oder einem Antibiotikumresistenzgen besteht. Einem Fachmann als Hefevektoren bekannt sind beispielsweise pBM272, pCS19, pEMBCYe23, pFL26, pG6, pNN414, pTV3 oder andere. Grundsätzlich kann das GLUT4-Gen jeder Spezies zur Expression gebracht werden. Bevorzugt wird ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte zur Expression gebracht. Die Polynukleotid- und Aminosäuresequenzen für Glut4 sind zugänglich beispielsweise über folgende Einträge in Genbank: M20747 (cDNA; Mensch), EMBL:D28561 (cDNA; Ratte), EMBL:M23382 (cDNA; Maus), Swissprot:P14672 (Protein; Mensch), Swissprot:P19357 (Protein; Ratte) und Swissprot:P14142 (Protein; Maus). Besonders bevorzugt wird das GLUT4-Gen mittels des Vektors YEp4H7-HsGlut4 (SEQ ID Nr. 9) zur Expression gebracht. Das GLUT4-Gen dieses Vektors ist menschlichen Ursprungs. Die Herstellung eines Hefevektors enthaltend ein GLUT4-Gen zur Expression in Zellen ist dem Fachmann geläufig. In den Beispielen wird die Herstellung solch eines Vektors beschrieben. Ein Hefevektor enthaltend ein Gen zur Expression wird, damit es zur Expression gebracht werden kann, durch Transformation in die Hefe eingeführt. Dazu eignen sich beispielsweise Methoden wie die Elektroporation oder die Inkubation kompetenter Zellen durch Vektor-DNA. Die Transformation ist eine dem Fachmann geläufige Technik zur Einführung von



~~Fremd-DNA insbesondere von Plasmiden oder Vektoren in Mikroorganismen wie~~  
Hefen oder Bakterien. In der einem Fachmann bekannten Methodensammlung  
„Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual;  
Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“ finden  
5 sich ausführliche Protokolle zu Transformation von Hefen, Hefevektoren, Selektion  
von Mutanten der Hefe oder die Expression von Proteinen in Hefen. Der Nachweis  
erfolgter Expression des GLUT4-Gens in einer Hefe dieser Erfindung kann  
insbesondere durch Northern-Blotting, Western-Blotting, Glukoseaufnahmestudien  
sowie Glukoseverwertungsstudien oder andere Methoden geführt werden. Beim  
10 Northern-Blotting wird isolierte RNA des zu untersuchenden Organismus auf  
einen Träger wie beispielsweise Nitrozellulose aufgebracht und fixiert, sowie  
anschließend durch Inkubation dieses mit der RNA des Organismus versehenen.  
Trägers mit radioaktiv oder über einen Fluoreszenzfarbstoff markierter DNA einer  
GLUT4-Polynukleotidsequenz detektiert. Die Expression von GLUT4-mRNA in einer  
15 Hefe dieser Erfindung erkennt man am Auftreten geschwärzter Banden. Im Vergleich  
dazu können mit der RNA einer sonst gleichen Hefe, die aber nicht mit einem  
GLUT4-haltigen Expressionsvektor transformiert wurde, keine geschwärzten Banden  
nachgewiesen werden. Beim Western-Blotting erfolgt der Nachweis des exprimierten  
Proteins nach Aufbringen eines Proteinextrakts des zu untersuchenden Organismus  
20 auf einen Membranträger wie Nitrozellulose über Antikörper. Antikörper für das  
Glut4-Protein sind beispielsweise erhältlich von Alpha Diagnostic International, Inc.,  
5415 Lost Lane, San Antonio, TX 78238 USA. Über diesen Anbieter können auch  
die zum Nachweis des gebundenen Antikörpers erforderlichen Testsysteme  
bezogen werden. Der Nachweis des exprimierten Glut4-Proteins wird im Vergleich  
25 zu einem sonst gleichen Hefestamm geführt, der kein Glut4-Protein enthält. Bei  
Glukoseaufnahmestudien wird dem zu untersuchenden Organismus radioaktiv  
markierte Glukose als einzige Kohlenstoffquelle angeboten. Die Hefe mit Glut4 als  
einzigem Glukosetransporter nimmt im Gegensatz zu einem sonst gleichen  
Kontrollstamm, der keinen Glut4 Transporter enthält, diese radioaktiv markierte  
30 Glukose ins Zellinnere auf. Die Glukoseverwertung kann auf Nährmedien getestet  
werden, die Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthalten. Der Hefestamm mit  
einem Glut4-Transportprotein als einzigem Glukosetransporter ist im Unterschied zur  
sonst gleichen Kontrolle ohne Glut4-Transporter in der Lage, sich im Nährmedium  
mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Diese eben erwähnten

Methoden sind dem Fachmann geläufig. Ausführliche Beschreibungen finden sich beispielsweise in „Current Protocols in Molecular Biology; Edited by: F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. m. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl; published by: John Wiley & Sons; 2000 (currently updated)“.

5

Die Erfindung betrifft bevorzugt einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wobei ein Glut4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte zur Expression gebracht wird.

10

Die Erfindung betrifft besonders bevorzugt einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wobei eine Polynukleotidsequenz enthaltend einen codierenden Bereich eines menschlichen Glut4-Gens zur Expression gebracht wird.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf einen oder mehrere der Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher beispielsweise unter dem Aktenzeichen DSM 14038, DSM 14039 oder DSM 14040 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig hinterlegt wurden. Diese Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Diese Liste enthält die Angaben zu den verwendeten Hefestämmen, in welche die Plasmide transformiert wurden, den Plasmiden sowie den Anzuchtbedingungen für diese Hefen.

20

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

25

a) Bereitstellung einer Hefe, die sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann;

b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid, welches ein GLUT4-Gen umfaßt, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht;

30

c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches eine Hexose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;

d) Selektion eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), der sich auf diesem Medium vermehrt und der die Hexoseaufnahme mittels des Glut-4 Gens unterstützt.

Die Erfindung betrifft ebenso die Vermehrung eines solchen Stammes.

- ~~Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein~~  
Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger
- 5 Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein Glut4-Gen, zur Expression bringt. Dies kann durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen, welche für die Hexosetransporter codieren, geschehen. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien.
- 10 Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder selektive Medien und andere. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wässrigen Lösungsmittel enthaltend unter
- 15 anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wässrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.
- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform der Herstellung eines Stammes der Hefe wie vorstehend beschrieben wird zur Transformation ein GLUT4-Gen, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht, verwendet. Zur Durchführung der Transformation sei auf das vorstehend bereits erwähnte
- 25 „Methods in Yeast Genetics“ verwiesen. Besonders bevorzugt für die Herstellung wird zur Transformation ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet. Weiterhin besonders bevorzugt wird zur Transformation ein GLUT4-Gen enthalten in einer Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 9 oder 10 verwendet. SEQ ID Nr. 9 offenbart die Polynukleotidsequenz
- 30 des Hefevektors Yep4H7-HsGLUT4. Dieser Vektor enthält eine Polynukleotidsequenz unter funktioneller Kontrolle des HXT7-Promotors, welche für die Aminosäuresequenz des menschlichen GLUT4-Gens codiert. In SEQ ID Nr. 10 ist die Polynukleotidsequenz des Vektors H2rg4g2 enthalten. Das Hefeplasmid H2rg4g2 trägt ein GLUT4-Gen der Ratte unter funktioneller Kontrolle eines HXT2-

Promotors. Funktionelle Kontrolle des GLUT4-Gens durch den Promotor bedeutet, daß mittels des Promotors eine mRNA transkribiert wird, die in ein Glut4-Protein translatiert werden kann. Bezüglich der Offenbarungen der GLUT4-Sequenzen und der verwendeten Methoden sei auf das bereits vorstehend ausgeführte hierzu  
5 verwiesen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- 10 a) Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung, der ein GLUT4-Gen exprimiert;
- b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem aufgenommen wird;
- c) Bereitstellung einer Verbindung;
- d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer  
15 Verbindung bereitgestellt gemäß c)
- e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
- f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines  
20 Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher sich auf Substraten  
25 mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt. Dieser Hefestamm wird mittels eines Hefevektors transformiert, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors enthält. Die  
30 Herstellung eines solchen Stammes der Hefe ist in den Beispielen beschrieben. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien. Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder

- selektive Medien und andere. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wässrigen Lösungsmittel enthaltend unter anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wässrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.
- 10 Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg Naßgewicht pro ml in beispielsweise 100 µl eines Puffers suspendiert und mit einer definierten
- 15 Menge von  $^{14}\text{C}$ - oder  $^3\text{H}$ - markierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC (Liquid Scintillation Counting = Flüssig-Szintillationszählung). Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend
- 20 beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann aber auch mittels Wachstumstests auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle erfolgen. Dazu bestimmt man die Wachstumsrate des Stammes nach Zugabe der Verbindung beispielsweise durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm und vergleicht diesen Wert mit der Wachstumsrate eines
- 25 Kontrollstammes (z.B. Wildtyphefestamm).
- Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung
- 30 gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wässrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborroboters. Solche

5 Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen, aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgefäßen oder Laborgläsern bestehen. Laborroboter sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborroboters wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

10

Nach In-Kontakt-Bringen der Hefe mit der Verbindung wird die Menge einer Hexose insbesondere von Glukose, die unter diesen Bedingungen von der Hefezelle ins Zellinnere befördert wird, bestimmt. Dazu kann man sich desselben Vorgehens bedienen, das bereits zur Bestimmung der Glukoseaufnahme für einen Stamm, der

15

Die Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-

20

Kontakt-Bringen mit der Verbindung.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das soeben beschriebene Verfahren unter Verwendung des Glut4 Gens identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur

25

Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Die Weiterentwicklung einer Verbindung, welche identifiziert wurde, bedeutet, daß zum einen die Spezifität hinsichtlich des Zielproteins, hier Glut4, verbessert wird, daß weiterhin die Verfügbarkeit im tierischen oder menschlichen Organismus erhöht wird sowie daß eventuell bestehende

30

unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden. Dafür stehen dem Fachmann eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen beispielhaft aber nicht abschließend die Verwendung pharmakologischer Tiermodelle wie der Zucker-Ratte oder ob/ob Maus, der Einsatz biochemischer in vitro Messungen, die Verwendung von virtuellen Strukturmodellen von Verbindungen und dem Glut4 Protein genannt

seien. Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder

- 5 Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.

Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglycämie)

- 10 aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zur gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien
- 15 Fettsäuren im Blut.

Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnorme Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme , die ein Gesundheitsrisiko beinhaltet.

- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren unter Verwendung des Glut4 Proteins identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur Therapie von Krankheiten oder körperliche
- 25 Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten, Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale Anwendung ist möglich mit Injektions- oder Infusionslösungen mit Ampullen,
- 30 Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- a) Bereitstellung eines Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich  
5 auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT1-Gen zur Expression bringt, wobei dieser Stamm ein GLUT1 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht.
- 10 b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in diesen Stamm bereitgestellt gemäß a) aufgenommen wird;
- c) Bereitstellung einer Verbindung;
- d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer Verbindung bereitgestellt gemäß c)
- 15 e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
- f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen  
20 gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge  
25 dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT1-Gen zur Expression bringt. Solche stämme sind bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM  
30 14031, DSM 14032 oder DSM 14034 hinterlegt.

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich drei Maltosetransporter bekannt, die in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem durch Deletion sämtliche Transporter,



die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.

- 5 Transformiert man in solch einen Hefestamm einen Plasmidvektor, welcher ein Glut1-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch keine Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von Glut1 erfordert weitere Anpassungen dieses Hefestammes, um den Glukosetransport mittels Glut1 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen Glukosetransporters Glut1
- 10 in die Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm, der keine intakten Hexose transportierenden Proteine mehr exprimiert mit einem Hefevektor, der ein GLUT1-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem Nährmedium ausgebracht, welches
- 15 Glukose als einziger Kohlenstoffquelle enthält und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30°C beobachtet man Wachstum von vereinzelt Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Wird diesem Stamm, der nun kein
- 20 Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT1-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.
- 25 Zur Transformation eines Hefestammes wird insbesondere ein GLUT1-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet. Polynukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen für Glut1 sind offenbart unter den folgenden Code-Nummern der angegebenen Datenbanken: EMBL:M20653 (cDNA; Mensch), EMBL:M13979 (cDNA; Ratte), EMBL:M23384 (cDNA; Maus), Swissprot:P11166 (Protein; Mensch),
- 30 Swissprot:P11167 (Protein; Ratte), Swissprot:P17809 (Protein; Maus).

Die Herstellung eines solchen Stammes der Hefe ist in den Beispielen beschrieben.. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung

erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien. Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder selektive Medien. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der  
5 Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual;  
10 Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahren wird ein Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bereitgestellt, der ein GLUT1 Gen unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors enthält. Solche für dieses  
15 Verfahren geeignete Stämme wurden bei der Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 14033, DSM 14026 oder DSM 14033 hinterlegt.

Ein GLUT1 Gen als Bestandteil eines Plasmids ist SEQ ID Nr. 11 oder SEQ ID Nr.  
20 12 offenbart. SEQ ID Nr. 11 enthält die Sequenz des Hefevektors Yep4H7-HsGlut1. In diesem Plasmid ist die Polynukleotidsequenz eines menschlichen GLUT1 Gens enthalten, welches unter funktioneller Kontrolle eines HXT7-Promotors steht. SEQ ID Nr. 12 enthält die Polynukleotidsequenz des Hefevektors H2rg1g2. Dieses Plasmid enthält die Polynukleotidsequenz eines GLUT1-Gens der Ratte unter funktioneller  
25 Kontrolle des HXT2-Promotors.

Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels  
30 Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg Naßgewicht in beispielsweise 100 µl eines Puffers suspendiert und mit einer definierten Menge von <sup>14</sup>C- oder <sup>3</sup>H- markierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der

Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC (Liquid Scintillation Counting; = Flüssig Szintillationszählung).

Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wäßrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

10

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborroboters. Solche Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen, aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgefäßen oder Laborgläsern bestehen. Laborroboter sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborroboters wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

20

Nach In-Kontakt-Bringen der Hefe mit der Verbindung wird die Menge einer Hexose insbesondere von Glukose, die unter diesen Bedingungen von der Hefezelle ins Zellinnere befördert wird, bestimmt. Dazu kann man sich desselben Vorgehens bedienen, das bereits zur Bestimmung der Glukoseaufnahme für einen Stamm, der nicht mit einer Verbindung in Kontakt gebracht wurde, beschrieben wurde.

25

Die Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen mit der Verbindung.

30

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das soeben beschriebene Verfahren unter Verwendung des Glut1 Gens identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur

Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Die Weiterentwicklung einer Verbindung, welche identifiziert wurde, bedeutet, daß zum einen die Spezifität hinsichtlich des Zielproteins, hier Glut4, verbessert wird, daß weiterhin die Verfügbarkeit im tierischen oder

5 menschlichen Organismus erhöht wird sowie daß eventuell bestehende unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden. Dafür stehen dem Fachmann eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen beispielhaft aber nicht abschließend die Verwendung pharmakologischer Tiermodelle wie der Zucker-Ratte oder ob/ob Maus, der Einsatz biochemischer in vitro Messungen, die Verwendung  
10 von virtuellen Strukturmodellen von Verbindungen und dem Glut1 Protein genannt seien. Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder  
15 Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.

Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglycämie)  
20 aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zur gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien  
25 Fettsäuren im Blut.

Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnorme Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme, die ein Gesundheitsrisiko beinhaltet.

30 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren unter Verwendung des Glut1 Proteins identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur Therapie von Krankheiten oder körperliche

- Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten, Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale Anwendung ist möglich mit Injektions- oder Infusionslösungen mit Ampullen, Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

- Die Erfindung betrifft weiterhin die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 sowie die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14. Die Polynukleotidsequenzen der SEQ ID Nr. 13 und 14 codieren für Mutationen des Glut1-Gens der Ratte, die im entsprechenden Protein zum Austausch einzelner Aminosäuren führen. Die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 codiert für ein Glut1-Protein, welches an Position 69 der Aminosäurekette einen Austausch von Valin durch Methionin enthält. Die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14 codiert für ein Glut1-Protein, bei dem an Position 70 der Aminosäurekette ein Alanin durch Methionin ausgetauscht ist. Beide Proteinmutanten unterstützen die Aufnahme von Glukose bereits in einen Stamm, dessen Hexosetransporter durch Deletion ausgeschaltet sind, der aber noch nicht die Glukoseaufnahme durch das Wildtyp-Glut1-Protein unterstützt. Solche Mutanten können beispielsweise über Selektion auf Suppressormutationen oder über in vitro Mutagenese erhalten werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Glut1-Protein, welches durch die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder 14 codiert wird.

- Die Erfindung betrifft auch Hefestämme, welche eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14 enthalten. Solche Hefestämme sind bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14026 und DSM 14027 hinterlegt. Für die Herstellung dieser Stämme werden Hefevektoren entsprechend der SEQ ID Nr. 13 oder 14 in einen Hefestamm transformiert, der sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit Hexose als einziger Kohlenstoffquelle eventuell wiederhergestellt wird, wenn in diesem Stamm ein Glut1 Gen zur Expression gebracht wird. Die Zellen werden dann nach der Transformation auf einem Medium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Die sich auf diesem Medium

vermehrden Kolonien werden isoliert. Der so transformierte Hefestamm eignet sich beispielsweise zur Durchführung eines Verfahrens zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert.

5

#### Abkürzungen

HXT Hexose Transporter

ORF Open Reading Frame

10 PCR Polymerase Chain Reaction

#### Beispiele

#### 15 Vermehrung der Hefestämme

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Hefestämme stammten vom Stamm CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*) ab. Die Herstellung eines Hefestammes mit Deletionen in den Hexose-Transportergenen (HXT) wurde von Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 - 128 (1999) beschrieben:

20 EBY.18ga (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*), EBY.VW4000 (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δmph2 Δmph3 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*). Die Medien beruhten auf 1% Hefeextrakt und 2% Pepton (YP), während die Minimalmedien aus 0,67% Difco-

25 Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (YNB) bestanden und Zusätze für Auxotrophiebedürfnisse sowie unterschiedliche Kohlenstoffquellen enthielten. Die Hefezellen wurden unter aerobischen Bedingungen bei 30°C auf einem Rundschüttler oder auf Agarplatten gezüchtet. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) verfolgt.

30

## Bestimmung der Glukoseaufnahme

Der Glukosetransport wurde als Aufnahme von D-[U-<sup>14</sup>C]-Glukose (Amersham) gemessen und die Kinetikparameter wurden aus Eadie-Hofstee-Graphiken bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und wieder in Phosphatpuffer in einer Konzentration von 60 mg (Naßgewicht) pro ml suspendiert. Die Glukoseaufnahme wurde bei Glukosekonzentrationen zwischen 0,2 und 100 mM bestimmt, und die spezifische Aktivität des Substrats bewegte sich zwischen 0,1 und 55,5 kBq  $\mu\text{mol}^{-1}$ . Die Zellen und die Glukoselösungen wurden 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Glukoseaufnahme wurde durch Versetzen der Zellen mit radioaktiver Glukose gestartet. Nachdem 5 Sekunden lang inkubiert worden war, versetzte man mit 10 ml eiskaltem Stoppuffer (0,1 M  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, 500 mM Glukose) und die Zellen wurden rasch auf Glasfaserfiltern ( $\varnothing=24$  mm, Whatman) abfiltriert. Die Filter wurden dreimal rasch mit eiskaltem Puffer gewaschen und die eingebaute Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Die Hemmung durch Cytochalasin B (Endkonzentration 20  $\mu\text{M}$ , gelöst in Ethanol) wurde in einem 15-Sekunden-Aufnahmetest mit 50 mM bzw. 100 mM radioaktiver Glukose gemessen, nachdem die Zellen 15 Minuten lang in Gegenwart des Hemmstoffs oder nur des Lösungsmittels inkubiert worden waren.

20

Konstruktion von H2rg4g2 (SEQ ID Nr. 10) und H2rg1g2 (SEQ ID Nr. 12)

H2rg4g2 und H2rg1g2 sind DNA-Konstrukte, welche einen HXT2-Promotor (Promotor des Glukosetransportproteins 2 der Hefe) enthalten, der funktionell mit einem GLUT4- (in SEQ ID Nr. 10) oder GLUT1-Gen (in SEQ ID Nr. 12) aus der Ratte verbunden ist. Es wurde ein 0,5 kB langes *SalI/EcoRI*-GAL2-Promoterfragment der Plasmide GLUT1-pTV3 bzw. GLUT4-pTV3 (Kasahara und Kasahara, *Biochem J.* 315, 177 – 182 (1996); Kasahara und Kasahara, *Biochim. Biophys. Acta* 857, 146 – 154 (1997)) jeweils mit einem 0,5 kB langen DNA-Fragment, das den Hefe-HXT2-Promoter von –452 bp bis +9 bp (Genbank: P23585) enthielt, ersetzt.

Konstruktion von YEp4H7-HsGLUT1 (SEQ ID Nr. 11) und YEp4H7-HsGLUT4 (SEQ ID Nr. 9)

YEp4H7-HsGLUT1 und YEp4H7-HsGLUT4 sind Plasmide, in welchen ein

5 Promotorfragment der Positionen -392 bis -1 des HXT7-Promotors (Promotor des HXT7-Gens) funktionell mit einem GLUT1- (In SEQ ID Nr. 11) oder GLUT4-Gen (in SEQ ID Nr. 9) des Menschen verbunden ist. Das Fragment des Promotors wurde verwendet, da der komplette HXT7-Promotor durch Glukose reprimiert wird.

Ein 0,4 kB langes *SacI/Spel*-MET25-Promoterfragment aus p426MET25 (Mumberg et al., Nucleic Acids Res. 22, 5767 – 5768 (1994)) wurde durch ein 0,4 kB langes

10 DNA-Fragment enthaltend ein *HXT7*-Promoterfragment von den Positionen -392 bis -1, das mittels PCR mit den Primern P426H7-1 (SEQ ID Nr. 1) und P426H7-2 (SEQ ID Nr. 2) aus einem HXT7-Gen (Genbank:P39004) als Matrize amplifiziert worden war, ersetzt, wodurch man das Plasmid YEp4H7 (SEQ ID Nr. 15) erhielt. Die

15 Human-GLUT1- und GLUT4-ORF (Open Reading Frame) wurden über 10 Zyklen mittels PCR mit den Primer-Paaren HSG1-F7/T2-HSG1 (SEQ ID Nr.3,4) für Glut1 und HSG4-F7/T2-HSG4 (SEQ ID Nr. 5,6) für Glut4 sowie einer humanen GLUT1 (EMBL:M20653) und humaner GLUT4-cDNA (Genbank:M20747) als Matrizen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nochmals über 10 Zyklen mit den Primern

20 T71-ORF (SEQ ID Nr. 7) sowie T2-HSG1 (SEQ ID Nr. 4) bzw. T2-HSG4 (SEQ ID Nr. 6) amplifiziert. Stromaufwärts und stromabwärts der GLUT-ORF-Sequenzen enthalten die PCR-Endprodukte Sequenzen, die zur *HXT7*-Promoter- bzw. zur *CYC1*-Terminationsregion (iso-Cytochrome c1) des Plasmids YEp4H7 homolog sind. Sie wurden gemeinsam mit dem mit *EcoRI* linearisierten YEp4H7 in den Hefestamm

25 EBY.F4-1 transformiert, wobei man nach homologer Rekombination in Hefe auf einem 2%igen Maltosemedium auf Uracilprototrophie selektierte.

Expression von Ratten-GLUT1 und -GLUT4 in einem hexosetransportdefizienten Hefestamm

30

Die Hefe-Multikopie-Expressionsplasmide GLUT1-pTV3e und GLUT4-pTV3e tragen die Ratten-Glukosetransportergene GLUT1 bzw. GLUT4 unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren und glukosereprimierbaren Hefe-GAL2-Promoters. In beiden Konstrukten wurde der GAL2-Promoter durch den glukoseinduzierbaren Hefe-HXT2-



- Promoter-ersetzt. Diese Vektoren wurden in den Hefestamm EBY.18ga ( $\Delta hxt$ ) transformiert, der zur Aufnahme von keinerlei Hexosen fähig ist und daher auf Medien, die Glukose oder andere Hexosen als einzige Kohlenstoffquelle enthalten, nicht wachsen kann. Die Zellen wurden auf ein tryptophanfreies synthetisches Medium mit Maltose als Kohlenstoffquelle ausplattiert. Die Transformanten wurden mit der Stempel-Methode auf das gleiche Basalmedium ohne Maltose, jedoch mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM) ausplattiert. Die Transformanten wuchsen auf den unterschiedlichen Glukosemedien nicht, nicht einmal bei bis zu einwöchiger Inkubation bei 30°C. Dies belegt, daß der Glut1- und Glut4-Glukosetransporter in einem normalen Stamm von *S. cerevisiae* die Aufnahme von Glukose nicht unterstützen.

#### Aufnahme von Glukose über den Glut1-Transporter in Hefezellen

- Es zeigte sich, daß nach längerer Inkubation von Glut1-Transformanten des Stamms EBY.18ga auf einem Glukosemedium sich Kolonien (im folgenden Supressormutanten oder Supressorkolonien) vermehren konnten, die offenbar fähig wurden, Glukose aufzunehmen und zu verwerten. Deshalb plattierte man die GLUT1- und GLUT4-Transformanten auf Agarplatten aus, die ein YNB-Medium mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle enthielten. Nach Bestrahlung mit UV-Licht in einer subletalen Dosis wurden die Zellen 7-14 Tage bei 30°C inkubiert. Während bei den GLUT4-Transformanten keine Suppressorkolonien erschienen, wuchsen auf den Agarplatten mit den GLUT1-Transformanten mehrere Suppressorkolonien, die zum Wachstum auf Glukose fähig waren. Mehrere der GLUT1-Suppressormutanten wurden mehr als 15 Generationen lang in nichtselektivem YP-Maltose-Medium gezüchtet. Alle Zellen, die ihre Plasmide verloren hatten, waren nicht länger fähig, auf Medien, die Glukose als Kohlenstoffquelle enthielten, zu wachsen. Damit konnte gezeigt werden, daß Wachstum auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle von GLUT1 abhängig war. Nach der Neutransformierung des ursprünglichen Wildtyp-H2rg1g2-Plasmids in diese Zellen erlangte einer von mehreren Hefestämmen wiederum die Fähigkeit, auf Glukose zu wachsen. Das belegt, daß dieser Stamm eine Mutation in seinem Genom enthält, die die Hemmwirkung auf funktionelle GLUT1-Expression eliminiert.

Das mutierte Allel wurde mit *fgy1-1* bezeichnet (was für "functional expression of GLUT1 in yeast" steht), und der Stamm wurde mit der Bezeichnung EBY.S7 versehen.

- 5 Aus anderen Suppressormutanten wurden H2rg1g2-Plasmide isoliert, in *E. coli* amplifiziert und in den ursprünglichen glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.18ga ( $\Delta hxt$ ) zurücktransformiert. Mehrere dieser Plasmide konnten ein Wachstum auf einem synthetischen Medium mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichen. Diese GLUT1-Sequenzen enthielten demnach
- 10 Mutationen, die das entsprechende GLUT1-Protein in der Hefe zu einem funktionellen Glukosetransporter umwandelten. Solche Mutanten enthielten beispielsweise einen Austausch von Valin nach Methionin an der Position der Aminosäure 69 (SEQ ID Nr.13) oder einen Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 (SEQ ID Nr. 14). Die Mutante gemäß SEQ ID Nr. 13
- 15 wurde im Mutantenscreening wie vorstehend beschrieben gefunden. Die Mutante gemäß SEQ ID Nr. 14 erhielt man durch in vitro Mutagenese wie im folgenden dargestellt. Das Prinzip der angewandten in vitro Mutagenese-Methode ist in Boles und Miosga (1995) beschrieben (Boles und Miosga, Curr Genet. 28, 197 – 198 (1995)). In einer ersten PCR-Reaktion wurde das Plasmid YEpH2-rGLUT1 (20 ng)
- 20 als DNA-Vorlage zusammen mit den Primern seqhxt2 (SEQ ID Nr. 16) und glutmet2 (SEQ ID Nr. 17) (jeweils 100 pmol) eingesetzt (PCR-Bedingungen: 95°C 45 sec, 50°C 30 sec, 72°C 2 min, 25 Zyklen, Taq-Polymerase). Der Primer glutmet2 enthält eine gegenüber dem normalen GLUT1-Gen geänderte Basensequenz, die zu einem Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 von
- 25 GLUT1 der Ratte führt. Das resultierende PCR-Fragment wurde mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das gereinigte PCR-Fragment (20 ng) zusammen mit dem Plasmid GLUT1-pTV3 (Kasahara und Kasahara, Biochem J. 315, 177 – 182 (1996)) als DNA-Vorlage (50 ng) und zusammen mit den Primern seqhxt2 und
- 30 seq2gal2 (SEQ ID Nr. 18) (jeweils 100 pmol) eingesetzt (PCR-Bedingungen: 95°C 45 sec, 54°C 30 sec, 72°C 2 min, 20 Zyklen, Taq-Polymerase). Da der Primer seqhxt2 nur an das Fragment der ersten PCR-Reaktion bindet, wurden in dieser zweiten PCR-Reaktion nur solche DNA-Sequenzen amplifiziert, die zu einem

Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 führen.

Das resultierende PCR-Fragment mit dem mutierten GLUT1-Gen wurde mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt und gegen das Wildtyp GLUT1-Gen im Plasmid YEpH2-rGLUT1 ausgetauscht. Dieses Plasmid (SEQ ID Nr. 14) wurde in den glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.18ga ( $\Delta hxt$ ) transformiert und ermöglichte ein Wachstum auf einem synthetischen Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle.

Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Glukose über den Glut4-

Transporter aufnehmen

Der Stamm EBY.S7 ( $\Delta hxt fgy1-1$ ) enthält offenbar eine Genommutation, nämlich *fgy1-1*, die Glut1 befähigt, in der Hefe funktionell zu werden und die Aufnahme von Glukose durch die Plasmamembran hindurch in die Zellen zu unterstützen.

Nach Transformation des Stamms EBY.S7 ( $\Delta hxt fgy1-1$ ) durch H2rg4g2 konnten Suppressor-Kolonien isoliert werden, die zur Vermehrung auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle befähigt waren.

Neun dieser GLUT4-Suppressormutanten wurden über mehr als 15 Generationen lang in nichtselektivem YP-Maltose-Medium gezüchtet. Alle Zellen, die ihre Plasmide verloren hatten, waren ebenfalls nicht mehr fähig, auf 10 mM Glukosemedien zu wachsen, was beweist, daß das frühere Wachstum GLUT4-abhängig war. Die H2rg4g2-Plasmide wurden aus den neun Suppressorstämmen wieder isoliert, in *E.*

*coli* amplifiziert und in den ursprünglichen glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.S7 zurücktransformiert. Keines der Plasmide konnte auf einem synthetischen Medium mit 10 mM Glukose als einzige Kohlenstoffquelle ein Wachstum ermöglichen. Damit wurde gezeigt, daß sie keine "aktivierte" Mutantenformen von GLUT4 enthielten. Nach der erneuten Transformation des ursprünglichen Wildtyp-

H2rg4g2 -Plasmids in die neun nunmehr plasmidfreien Suppressorstämmen erlangten diese alle wiederum die Fähigkeit zurück, auf Glukose wachsen zu können, und zwar im Unterschied zu Transformanten, die einen Kontrollvektor ohne Glut4-Transportproteingen enthielten. Die entsprechenden Mutationen dieses Stammes

wurden *fgy4-X* ( $x = 1 - 9$ ) genannt. Die mutierten Allele *fgy4-X* bewirken die funktionelle GLUT4-Expression eines in diesen Stämmen exprimierten GLUT4-Gens. Damit konnte die Aufgabe der Erfindung gelöst werden. Die Tabelle enthält eine Übersicht der verwendeten Hefestämme dieser Erfindung.

Die Tabelle gibt eine Übersicht der in dieser Erfindung verwendeten Hefestämme einschließlich des Genotyp, den für die Vermehrung einzuhaltenden Wachstumsbedingungen und der jeweiligen Hinterlegungsnummer bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

## Patentansprüche

1. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit  
5 Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn in diesem Stamm ein GLUT4-Gen zur Expression gebracht wird.
- 10 2. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 1 wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037.
3. Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 1  
15 oder 2, erhältlich durch
  - a) Bereitstellung einer Hefe,
  - b) Beseitigung der Funktion aller Hexosetransporter dieser Hefe aus a) durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen.
- 20 4. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei dieser Stamm ein GLUT4-Gen enthält.
5. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 4, wobei ein rekombinantes GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe  
25 exprimierbaren Promotors steht.
6. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 4 oder 5, wobei das Glut4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte stammt.
- 30 7. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 6 wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14038, DSM 14039 oder DSM 14040.

~~8.~~ Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 7, erhältlich durch

- a) Bereitstellung einer Hefe gemäß Anspruch 1 bis 3;
- b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid, welches ein GLUT-4 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht;
- c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;
- d) Isolierung eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), welcher sich auf einem solchen Medium vermehrt.

9. Herstellung nach Anspruch 8, wobei zur Transformation ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet wird.

10. Herstellung nach Anspruch 8 oder 9, wobei zur Transformation ein Vektor, der eine Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 9 oder 10 enthält, verwendet wird.

11. Verfahren verwendbar zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- a) Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 10;
- b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem Stamm, der gemäß a) bereitgestellt wird, aufgenommen wird;
- c) Bereitstellung einer Verbindung;
- d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer Verbindung bereitgestellt gemäß c)
- e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
- f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

12. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

5

13. Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

10 14. Verfahren verwendbar zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

a) Bereitstellung eines Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren

15 kann, und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein Glut1-Gen zur Expression bringt, wobei dieser Stamm ein GLUT-1 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht.

b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem Stamm bereitgestellt gemäß a) aufgenommen wird;

c) Bereitstellung einer Verbindung;

d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe gemäß a) mit einer Verbindung gemäß c)

e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;

f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

30

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei gemäß a) ein Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit der Stammnummer DSM 14026, DSM 14027 oder DSM14033 bereitgestellt wird.

16. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

5

17. Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

10 18. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter dem Aktenzeichen DSM 14026 oder DSM 14027.

15 19. Herstellung eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 18, erhältlich durch

- a) Bereitstellung einer Hefe gemäß Anspruch 1 bis 3;
- b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid enthaltend eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder 14;
- 20 c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;
- d) Isolierung eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), welcher sich auf einem solchen Medium vermehrt.

25 20. Polynukleotidsequenz codierend für ein GLUT1-Protein enthaltend einen Austausch von Valin nach Methionin an Position 69 der Aminosäuresequenz.

21. Polynukleotidsequenz nach Anspruch 20 enthaltend eine Sequenz der SEQ ID Nr. 13.

30 22. Glut1-Protein codiert durch eine Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 20 oder 21.

23. Polynukleotidsequenz codierend für ein GLUT1-Protein enthaltend einen Austausch von Alanin nach Methionin an Position 70 der Aminosäuresequenz.



24. Polynukleotidsequenz nach Anspruch 23 enthaltend eine Sequenz der SEQ ID  
Nr. 14.

5 25. Glut1-Protein codiert durch eine Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 23 oder  
24.

10

15

20

25

30

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit  
funktioneller Expression eines Glut-Transporters

<130> 2001/0002

<140> 10106718.6

<141> 2001-02-14

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ctagagctcg taggaacaat ttcgg

25

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

cgactagtgt gatggtgatg gtgatgcatg ttaacttttt gattaaaatt aaaaaaactt 60

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ttaattttta tcaaaaaatg gagcccagca gcaag

35

<210> 4

<211> 52

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 4

acatgactcg aggtcgacgg tatcgataag cttatcacac ttgggaatca gc

52

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

ttaattttta tcaaaaaatg cgcgcgggct tccaa

35

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 52

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

acatgactcg aggtcgacgg tatcgataag cttatcagtc gttctcatct gg

52

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 7

caaagaataa acacaaaaaac aaaaagtttt ttaatttta atcaaaaaat gtctgaattc 60

agcagcaaga agg

73

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 8

aagtttcttt gtctccgtcc cactcaactt tctgagaaca aatgatcgac aaataatagg 60

tttaggtaag g

71

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7828

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

atgccgtcgg gcttccaaca gataggctcc gaagatgggg aacccccctca gcagcgagtg 60  
actgggaccc tggctccttg tgtgttctct gcggtgcttg gctccctgca gtttgggtac 120  
aacattgggg tcatcaatgc ccctcagaag gtgattgaac agagctacaa tgagacgtgg 180  
ctggggaggg aggggacctga gggaccacgc tccatccctc caggcacccct caccaccctc 240  
tggggccctct cgtgggcat cttttccgtg ggcggcatga tttcctcctt cctcattggt 300  
atcatctctc agtggcttg aaggaaaagg gccatgctgg tcaacaatgt cctggcggtg 360  
ctggggggca gcctcatggg cctggccaac gctgctgct cctatgaaat gctcatcctt 420  
ggacgattcc tcattggcgc ctactcaggg ctgacatcag ggctgggtgcc catgtacgtg 480  
ggggagattg ctcccactca cctgcggggc gccctgggga cgtcaacca actggccatt 540  
gttatcggca ttctgatcgc ccagggtgctg ggcttggagt cctcctggg cactgccagc 600  
ctgtggccac tgctcctggg cctcacagtg ctacctgcc tcctgcagct ggtcctgctg 660  
cccttctgtc ccgagagccc ccgtacctc tacatcatcc agaattctga ggggcctgcc 720  
agaaagagtc tgaagcgctt gacaggctgg gccgatgttt ctggagtgtt ggctgagctg 780  
aaggatgaga agcggaagct ggagcgtgag cggccactgt cctgctcca gtcctgggc 840  
agccgtaccc accggcagcc cctgatcatt gcggtcgtgc tgcagctgag ccagcagctc 900  
tctggcatca atgctgtttt ctattattcg accagcatct tcgagacagc aggggtaggc 960  
cagcctgcct atgccaccat aggagctggg gtggtcaaca cagtcttcac cttggtctcg 1020  
gtgttggttg tggagcgggc ggggcgcggc acgctccatc tcctgggcct ggcgggcatg 1080  
tgtggctgtg ccatcctgat gactgtggct ctgctcctgc tggagcgagt tccagccatg 1140  
agctacgtct ccattgtggc catctttggc ttcgtggcat tttttgagat tggccctggc 1200  
cccattcctt ggttcatcgt ggccgagctc ttcagccagg gaccccgccc ggcagccatg 1260  
gctgtggctg gtttctccaa ctggacgagc aacttcatca ttggcatggg tttccagtat 1320  
gttgcgagg ctatggggcc ctacgtcttc cttctatttg cggctcctcct gctgggcttc 1380  
ttcatcttca ccttcttaag agtacctgaa actcgaggcc ggacgtttga ccagatctca 1440  
gctgccttcc accggacacc ctctctttta gagcaggagg tgaaaccag cacagaactt 1500  
gagtatttag ggccagatga gaacgactga taagcttata gataccgtcg acctcgagtc 1560  
atgtaattag ttatgtcacg cttacattca cgcctcccc ccacatccgc tctaaccgaa 1620  
aaggaaggag ttagacaacc tgaagtctag gtccctatctt atttttttat agttatgtta 1680  
gtattaagaa cgttatttat atttcaaatt tttctttttt ttctgtacag acgctgttac 1740  
gcatgtaaca ttatactgaa aacottgctt gagaagggtt tgggacgctc gaaggcttta 1800  
atttgcgcc ggtacccaat tcgcctata gtgagtcgta ttacgcgcgc tactggccg 1860  
tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgagc 1920  
cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc 1980  
aacagttgcg cagcctgaat ggcgaaatggc gcgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg 2040  
cggcggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgcagcgcc ctagcgccc 2100  
ctcctttcgc tttcttccct tctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 2160  
taaactcggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa 2220  
aacttgatta ggggtgatgg tcaagtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc 2280  
ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac 2340  
tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgocgatt tcggcctatt 2400  
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt 2460  
ttacaatttc ctgatgcggg attttctcct tacgcatctg tgcgggtattt cacaccgcat 2520  
agggtataaa ctgatataat taaattgaag ctctaatttg tgagtttagt atacatgcat 2580  
ttacttataa tacagttttt tagttttgct ggocgcatct totcaaatat gcttccagc 2640  
ctgcttttct gtaacgttca cctctacct tagcatccct tccctttgca aatagtcctc 2700  
ttccaacaat aataatgtca gatcctgtag agaccacatc atccacggtt ctatactgtt 2760  
gacccaatgc gtctcccttg tcatctaaac ccacaccggg tgtcataatc aaccaatcgt 2820  
aaccttcata tcttccaccc atgtctcttt gagcaataaa gccgataaca aaatctttgt 2880

cgctcttcgc aatgtcaaca gtacccttag tatattctcc agtagatagg gagcccttgc 2940  
 atgacaattc tgctaacatc aaaaggcctc taggttcctt tgttacttct tctgccgcct 3000  
 gcttcaaacc gctaacaata cctggggcca ccacaccgtg tgcattcgta atgtctgccc 3060  
 attctgctat tctgtatata cccgcagagt actgcaattt gactgtatta ccaatgtcag 3120  
 caaattttct gtcttcgaag agtaaaaaat tgtacttggc ggataatgcc tttagcggct 3180  
 taactgtgcc ctccatggaa aaatcagtc aagatatccac atgtgttttt agtaaacaaa 3240  
 ttttgggacc taatgcttca actaactcca gtaattcctt ggtggtacga acatccaatg 3300  
 aagcacacaa gtttgtttgc ttttcgtgca tgatattaaa tagcttggca gcaacaggac 3360  
 taggatgagt agcagcacgt tccttatatg tagctttcga catgatttat cttcgtttcc 3420  
 tgcaggtttt tgttctgtgc agttgggtta agaatactgg gcaatttcat gtttcttcaa 3480  
 cactacatat gcgtatatat accaatctaa gtctgtgctc cttccttcgt tcttccttct 3540  
 gttcggagat taccgaatca aaaaaatttc aaagaaaccg aaatcaaaaa aaagaataaa 3600  
 aaaaaaatga tgaattgaat tgaaaagctg tggatatggg cactctcagt acaatctgct 3660  
 ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac 3720  
 gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 3780  
 tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac 3840  
 gcctattttt atagggtaat gtcattgataa taatggtttc ttagtatgat ccaatatcaa 3900  
 aggaaatgat agcattgaag gatgagacta atccaattga ggagtggcag catatagaac 3960  
 agctaaaggg tagtgctgaa ggaagcatac gataccccgc atggaatggg ataatatcac 4020  
 aggaggtact agactacctt tcatcctaca taaatagacg catataagta cgcatttaag 4080  
 cataaacacg cactatgccg ttcttctcat gtatatatat atacaggcaa cacgcagata 4140  
 taggtgcgac gtgaacagt agctgtatgt gcgcagctcg cgttgcattt tcggaagcgc 4200  
 tcgttttcgg aaacgccttg aagttcctat tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag 4260  
 gaacttcaga gcgcttttga aaacccaaaag cgctctgaag acgcactttc aaaaaaccaa 4320  
 aaacgcaccg gactgtaacg agctactaaa atattgcgaa taccgcttcc acaaacattg 4380  
 ctcaaaagta tctctttgct atatatctct gtgctatatc cctatataac ctaccatcc 4440  
 accttcgct ccttgaactt gcattctaac tcgacctcta catTTTTtTat gtttatctct 4500  
 agtattactc ttttagacaaa aaaattgtag taagaactat tcatagagtg aatcgaaaac 4560  
 aatacgaaaa tgtaaacatt tcctatacgt agtatataga gacaaaatag aagaaaccgt 4620  
 tcataatttt ctgaccaatg aagaatcatc aacgctatca ctttctgttc acaaagtatg 4680  
 cgcaatccac atcgggtatag aatataatcg gggatgcctt tatcttgaaa aaatgcacc 4740  
 gcagcttcgc tagtaatcag taaacgcggg aagtggagtc aggctttttt tatggaagag 4800  
 aaaatagaca ccgaagtgc cttcttctaa ccttaacgga cctacagtgc aaaaagtat 4860  
 caagagactg cattatagag cgcacaaaag agaaaaaaag taatctaaga tgctttgtta 4920  
 gaaaaatagc gctctcgga tgcatttttg tagaacaaaa aagaagtata gattctttgt 4980  
 tggtaaaaata gcgctctcgc gttgcatttc tgttctgtaa aaatgcagct cagattcttt 5040  
 gtttgaaaaa ttagcgctct cgcgttgcat ttttgtttta caaaaatgaa gcacagattc 5100  
 ttcgttggta aaatagcgt ttcgcgttgc atttctgttc tgtaaaaatg cagctcagat 5160  
 tctttgtttg aaaaattagc gctctcgcgt tgcatttttg ttctacaaaa tgaagcacag 5220  
 atgcttcgtt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt 5280  
 ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa 5340  
 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattccctt 5400  
 tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat 5460  
 gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggttaag 5520  
 atccttgaga gttttcgcgc cgaagaacgt tttccaatga tgagcattt taaagtcttg 5580  
 ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata 5640  
 cactattctc agaatgactt gggtgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 5700  
 ggcattgacag taagagaatt atgcagtgt gccataacca tgagtataa cactgcggcc 5760

aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg 5820  
ggggatcatg taactcgcct tgatcggttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 5880  
gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact 5940  
ggcgaactac ttactctage ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa 6000  
gttgaggac cacttctgcg ctccggccct cgggctggct ggtttattgc tgataaatct 6060  
ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc 6120  
tcccgtatcg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 6180  
cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggg aactgtcaga ccaagtttac 6240  
tcatatatac tttagattga tttaaaactt ctttttaaat ttaaaaggat ctagggtgaag 6300  
atcctttttg ataatctcat gacaaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg 6360  
tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 6420  
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 6480  
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 6540  
cttctagtgt agcgtagtgt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 6600  
ctcgtcttgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 6660  
gggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt 6720  
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 6780  
gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 6840  
ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt 6900  
tatagtctg tcgggtttcg ccacctctga cttagcgtc gatttttgtg atgctcgtca 6960  
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt 7020  
tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 7080  
attaccgctt ttgagtgage tgataccgct cgcgcagacc gaacgaccga gcgcagcgag 7140  
tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcca atacgcaaac cgctctccc cgcgcggttg 7200  
ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc 7260  
aacgcaatta atgtgagtta cctactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt 7320  
ccggctccta tgttgtgtg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat 7380  
gacctgatt acgccaagcg cgcaattaac cctactaaa gggaacaaaa gctggagctc 7440  
gtaggaacaa tttcggggcc ctgctgttct ttctgaggtt catcttttac atttgcttct 7500  
gctggataat tttcagaggc aacaaggaaa aattagatgg caaaaagtcg tctttcaagg 7560  
aaaaatcccc accatcttct gagatccct gtaacttatt ggcaactgaa agaataaaaa 7620  
ggagggaaaat acaaaatata ctagaactga aaaaaaaaaa gtataaatag agacgatata 7680  
tgccaatact tcacaatgtt cgaatctatt cttcatttgc agctattgta aaataataaa 7740  
acatcaagaa caacaagct caacttgtct tttctaagaa caaagaataa acacaaaaac 7800  
aaaaagtttt ttttaatttta atcaaaaa

7828

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 2386

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 10

tcgactctag aggatccct taagctaate cttatgaate cggagaaaag cgggggtcttt 60  
taactcaata aaattttccg aaatcctttt tctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
gtggctcttc cacctgtttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180  
gtttttgcga tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgccgcta acgatagtaa 240  
taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc ctttttttat gttttcaaaa 300

```

cctagcaacc. cccaccaaac ttgtcatcgt tcccggattc acaaagata taaaaagcga 360
ttacaattct acattctaac cagatttgag atttcctctt tctcaattcc tcttatatta 420
gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480
tccagcagat cggctctgaa gatggggaac cccctcagca gcgagtact gggacactgg 540
tccttgctgt attctcagct gtgcttggtt cccttcagtt tggctataac attggagtca 600
tcaacgcccc acagaaagtg attgaacaga gctacaatgc aacttggttg ggtaggcagg 660
gtcctggggg accggactcc atcccacaag gcaccctcac taccctttgg gctctctccg 720
tggccatctt ctctgtgggt ggcatgattt cctcctttct cattggcatc atttctcaat 780
ggttgggaag gaaaagggtt atgctggcca acaatgtctt ggctgtgctg gggggcgccc 840
tcatgggcct agccaatgcc gcggcctcct atgagatact cattctcgga cggttcctca 900
ttggcgccca ctcagggtta acatcagggt tgggtgcctat gtatgtggga gaaatcgccc 960
ccactcatct tcgggggtgcc ttgggaacac tcaaccaatt ggccatcgtc attggcattc 1020
tggttgcccc ggtgttgggt ttggagtcta tgctgggcac agctaccctg tggccattgc 1080
ttctggctat cacagtactc cctgctctcc tgcagctgct tctgttgccc ttctgtcctg 1140
agagcccccg atacctctac atcatccgga acctggaggg gcctgccga aagagtctaa 1200
agcgctgac aggtctgggt gatgtgtctg atgcactggc tgagctgaag gatgagaaac 1260
ggaagttgga aagagagcgt ccactgtcct tgctgcagct cctgggcagc cgcacccacc 1320
ggcagcctct gattattgca gtggtgctgc agctgagcca gcagctctca ggcattcaatg 1380
ctgttttcta ctattcaacc agcatctttg agtttagctgg ggtggaacag ccagcctacg 1440
ccaccatagg agctggtgtg gtcaataccg tcttcacgtt ggtctcggtg ctcttagtag 1500
agcgagctgg gcgacggaca ctccatctcc tgggcctggc aggcattgtg ggctgtgcca 1560
tcttgatgac ggtggctctg ctgctgctgg agcgggttcc atccatgagt tatgtgtcca 1620
tcgtggccat atttggcttt gtggccttct ttgagattgg tcctggcccc atccctggt 1680
tcattgtggc cgagctcttc agccagggcc ccgcccagc agccatggct gtagctggtt 1740
tctccaactg gacctgtaac ttcacgtttg gcatgggttt ccagtatgtt gcggatgcta 1800
tgggtcccta cgtcttcctt ctatttgccg tctcctgct tggcttcttc atcttcacct 1860
tcctaagagt gcctgaaacc agaggccgga catttgacca gatctcgcc accctccgac 1920
ggacaccttc tctcttagag caggaggtga aaccagtagc agaacttgaa tacttagggc 1980
cagatgagaa tgactaatcg atttgaagtg agacgctcca tcatctctct taatttttca 2040
tgactgacgt tttttcttca ttttaattat catagtattt gtttgaaaaa aaaaaaaaaa 2100
aatttccctt atcaatgata tccttacgat tatataaatt ccttacctaa acctattatt 2160
tgtgtacata tatcagagta ttattacata tataaccttt ttctctaaaa caggaaaaaa 2220
aaaagaaaac gataacatgc tctgccatcc tttgttcacc gagcaaaatt aaaacgcaa 2280
aatgaattgt ccotatgaaa ttattaaagg accacatcac cagacttata tctggggggt 2340
cctctagaaa ataagtcagg tacttgctg gactttcttc cagttg 2386

```

<210> 11

<211> 7777

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

atggagccca gcagcaagaa gctgacgggt cgcctcatgc tggctgtggg aggagcagtg 60
cttggtccc tgcagtttgg ctacaacact ggagtcacatc atgcccccca gaaggtgatc 120
gaggagttct acaaccagac atgggtccac cgctatgggg agagcatcct gccaccacg 180
ctcaccacgc tctggtccct ctcaagtggc atcttttctg ttgggggcat gattggtccc 240
ttctctgtgg gccttttctg taaccgcttt ggccggcgga attcaatgct gatgatgaac 300

```

ctgctggcct tcgtgtccgc cgtgctcatg ggcttctcga aactgggcaa gtcctttgag 360  
atgctgatcc tgggcccgtt catcatcggg gtgtactgcg gcctgaccac aggcttcgtg 420  
cccatgtatg tgggtgaagt gtcaccacaca gcctttcgtg gggccctggg caccctgcac 480  
cagctgggca tcgtgtcggg catcctcatc gccaggtgt tcggcctgga ctccatcatg 540  
ggcaacaagg acctgtggcc cctgctgctg agcatcatct tcatcccggc cctgctgcag 600  
tgcacgtgtc tgcccttctg ccccgagagt ccccgcttcc tgctcatcaa ccgcaacgag 660  
gagaaccggg ccaagagtgt gctaaagaag ctgctcgagg cagctgacgt gacccatgac 720  
ctgcaggaga tgaaggaaga gctcggcag atgatgcggg agaagaagg caccatcctg 780  
gagctgttcc gtcccccgc ctaccgccag cccatcctca tcgtgtggt gctgcagctg 840  
tcccagcagc tgtctggcat caacgctgtc ttctattact ccacgagcat cttegagaag 900  
gcgggggtgc agcagcctgt gtatgccacc attggctccg gtatcgtaa caggcccttc 960  
actgtcgtgt cgctgtttgt ggtggagcga gcaggccggc ggaccctgca cctcataggc 1020  
ctcgtggca tggcgggttg tgccatactc atgaccatcg cgctagcact gctggagcag 1080  
ctaccctgga tgtcctatct gagcatcgtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa 1140  
gtgggtcctg gccccatccc atggttcacg gtggctgaac tcttcagcca gggccacgt 1200  
ccagctgcca ttgccgttg aggtctctcc aactggacct caaatttcat tgtgggcatg 1260  
tgcttccagt atgtggagca actgtgtggt cctacgtct tcatcatctt cactgtgctc 1320  
ctgggtctgt tcttcatctt cactacttc aaagtccctg agactaaagg ccggaccttc 1380  
gatgagatcg cttccggctt ccggcagggg ggagccagcc aaagtataa gacaccgag 1440  
gagctgttcc atcccctggg ggctgattcc caagtgtgat aagcttatcg ataccgtcga 1500  
cctcgagtca tgtaattagt tatgtcacgc ttacattcac gccctcccc cacatccgt 1560  
ctaaccgaaa aggaaggagt tagacaacct gaagtctagg tccctattta tttttttata 1620  
gttatgttag tattaagaac gttatttata tttcaaattt ttcttttttt tctgtacaga 1680  
cgctgtacg catgtaacat tatactgaaa accttgcttg agaaggtttt gggacgctcg 1740  
aaggctttaa tttgcggccg gtacccaatt cgccctatag tgagtcgtat tacgcgcgt 1800  
cactggccgt cgtttttaca cgtcgtgact gggaaaacc tggcgttacc caacttaatc 1860  
gccttgacg acatccccct ttccgcagct ggcgtaatat cgaagaggcc cgcaccgatc 1920  
gcccttcca acagttgctg agcctgaat gcgaatggcg cgacgcgccc tgtagcggcg 1980  
cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc 2040  
tagcgcccgc tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc cacttccgc ggccttcccc 2100  
gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg 2160  
acccccaaaa acttgattag ggtgatggtt cactagtggt gccatcgccc tgatagacgg 2220  
tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatat tggactcttg ttccaaactg 2280  
gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggttt ttgccgattt 2340  
cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa 2400  
tattaacgtt tacaatttcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 2460  
acaccgcata gggtaataac tgatataatt aaattgaagc tctaatttgt gagtttagta 2520  
tacatgcatt tacttataat acagtttttt agttttgctg gccgcactct ctcaaataatg 2580  
cttcccagcc tgctttttctg taacgttcac cctctacctt agcatccctt ccctttgcaa 2640  
atagtctctt tccaacaata ataatgtcag atcctgtaga gaccacatca tccacggttc 2700  
tatactgttg acccaatgcg tctcccttgt catctaaacc cacaccgggt gtcataatca 2760  
accaatcgta accttcatct ctccaccca tgtctctttg agcaataaag ccgataacaa 2820  
aatctttgtc gctcttcgca atgtcaacag tacccttagt atattctcca gtagataggg 2880  
agcccttgca tgacaattct gctaacatca aaaggcctct aggttccttt gttacttctt 2940  
ctgcccgtc cttcaaaccg ctaacaatac ctgggcccac cacaccgtgt gcattcgtaa 3000  
tgtctgccc ttctgctatt ctgtatacac ccgcagagta ctgcaatttg actgtattac 3060  
caatgtcagc aaattttctg tcttcgaaga gtaaaaaatt gtacttggcg gataatgcct 3120  
ttagcggctt aactgtgccc tccatggaaa aatcagtcaa gatatccaca tgtgttttta 3180



gtaaacaat tttgggacct aatgcttcaa ctaactccag taattccttg gtggtacgaa 3240  
 catccaatga agcacacaag tttgtttgct tttcgtgcat gatattaaat agcttggcag 3300  
 caacaggact aggatgagta gcagcacgtt ctttatatgt agctttcgac atgatttatc 3360  
 ttcgtttcct gcagggtttt gttctgtgca gttgggttaa gaatactggg caatttcatg 3420  
 tttcttcaac actacatatg cgtatatata ccaatctaag tctgtgetcc ttccttcgtt 3480  
 cttccttctg ttcggagatt accgaatcaa aaaaatttca aagaaaccga aatcaaaaaa 3540  
 aagaataaaa aaaaaatgat gaattgaatt gaaaagctgt ggtatggtgc actctcagta 3600  
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaca cccgctgacg 3660  
 cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 3720  
 ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcacgaa acgcgcgaga cgaaagggcc 3780  
 tctgtatagc cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagtatgatc 3840  
 caatatcaaa ggaaatgata gcattgaagg atgagactaa tccaattgag gagtggcagc 3900  
 atatagaaca gctaaaggg agtgctgaag gaagcatagc ataccgca tggaatggga 3960  
 taatatcaca ggaggtacta gactacctt catcctacat aaatagacgc atataagtac 4020  
 gcatttaagc ataaacacgc actatgccgt tcttctcatg tatatatata tacaggcaac 4080  
 acgcagatat aggtgcgacg tgaacagtga gctgtatgtg cgcagctcgc gttgcatttt 4140  
 cggaagcgcct cgttttcgga aacgctttga agttcctatt ccgaagttcc tattctctag 4200  
 aaagtatagg aacttcagag cgcttttgaa aaccaaaagc gctctgaaga cgcactttca 4260  
 aaaaaccaa aacgcaccgg actgtaacga gctactaaaa tattgccaat accgcttcca 4320  
 caaacattgc tcaaaagtat ctctttgcta tatatctctg tgctatatcc ctatataacc 4380  
 taccatcca ctttcgctc cttgaacttg catctaaact cgacctctac attttttatg 4440  
 tttatctcta gtattactct ttagacaaaa aaattgtagt aagaactatt catagagtga 4500  
 atcgaaaaca atacgaaaat gtaaacattt cctatacgta gtatatagag acaaaataga 4560  
 agaaaccgtt cataattttc tgaccaatga agaatcatca acgctatcac tttctgttca 4620  
 caaagtatgc gcaatccaca tcggtataga atataatcg ggatgccttt atcttgaaaa 4680  
 aatgcacccg cagcttcgct agtaatcagt aaacgcggga agtggagtca ggcttttttt 4740  
 atggaagaga aaatagacac caaagtagcc ttcttctaac cttaacggac ctacagtga 4800  
 aaaagttatc aagagactgc attatagagc gcacaaagga gaaaaaaagt aatctaagat 4860  
 gctttgttag aaaaatagcg ctctcgggat gcatttttgt agaacaaaaa agaagtatag 4920  
 attctttgtt ggtaaaatag cgctctcgcg ttgcatttct gttctgtaaa aatgcagctc 4980  
 agattctttg tttgaaaaat tagcgtctc gcgttgcat tttgttttac aaaaatgaag 5040  
 cacagattct tcgttggtaa aatagcgctt tcgcgttgca tttctgttct gtaaaaatgc 5100  
 agctcagatt ctttggttga aaaattagcg ctctcgcgtt gcatttttgt tctacaaaat 5160  
 gaagcacaga tgcttcgttc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt 5220  
 tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 5280  
 atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctt 5340  
 attccctttt ttgcggcatt ttgccttct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa 5400  
 gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac 5460  
 agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt 5520  
 aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgg 5580  
 cgccgcatac actatttctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 5640  
 cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtct ccataaccat gagtgataac 5700  
 actgcggcca acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 5760  
 cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc 5820  
 ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa 5880  
 ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag 5940  
 gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggtggctg gtttattgct 6000  
 gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat 6060

ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa 6120  
 cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac 6180  
 caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 6240  
 taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 6300  
 cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcctt cttgagatcc tttttttctg 6360  
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggg ttgtttgccg 6420  
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 6480  
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 6540  
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc 6600  
 tgtcttaccg gggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 6660  
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagccttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 6720  
 ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 6780  
 ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 6840  
 tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 6900  
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacgggtc 6960  
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttctcg cgttatcccc tgattctgtg 7020  
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 7080  
 cgcagcgagt cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 7140  
 gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc 7200  
 agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttac ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac 7260  
 tttatgcttc cggctcctat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga 7320  
 aacagctatg accatgatta cgccaagcgc gcaattaacc ctactaaag ggaacaaaag 7380  
 ctggagctcg taggaacaat ttccggcccc tgctgtttct tctgaggttc atcttttaca 7440  
 tttgcttctg ctggataatt ttcagaggca acaaggaaaa attagatggc aaaaagtcgt 7500  
 ctttcaagga aaaatcccca ccatctttcg agatccctg taacttattg gcaactgaaa 7560  
 gaatgaaaag gaggaataa caaatatac tagaactgaa aaaaaaaaag tataaataga 7620  
 gacgatatat gccaatatt cacaatgttc gaatctattc ttcatttgca gctattgtaa 7680  
 aataataaaa catcaagaac aaacaagctc aacttgtctt ttctaagaac aaagaataaa 7740  
 cacaaaaaca aaaagttttt ttaattttta tcaaaaa 7777

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 2338

&lt;212&gt; DNA

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 12

tcgactctag aggatccctt taagctaate ottatgaate cggagaaaag cgggggtcttt 60  
 taactcaata aaatttttccg aaatcctttt tctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
 gtggctcttc cacctgtttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180  
 gtttttgcca tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgccgccta acgatagtaa 240  
 taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc ctttttttat gttttcaaaa 300  
 cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatcgt tcccggattc acaaatgata taaaaagcga 360  
 ttacaattct acattctaac cagatttgag atttctctt tctcaattcc tcttatatta 420  
 gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480  
 tcagcaagaa ggtgacgggc cgccttatgt tggccgtggg aggggcagtg ctcgatccc 540  
 tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccca gaaggtaatt gaggagtctt 600  
 acaatcaaac atggaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccaca ctccaccac 660

```

tctgggtctct ctccgtggcc atcttctctg tcgggggcat gattgggtcc ttctctgtgg 720
gcctctttgt taatcgcttt ggcaggcgga actccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780
ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctoca aactgggcaa gtcctttgag atgctgatcc 840
tgggcccgtt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggctttgtg cccatgtatg 900
tgggggaggt gtcaccaca gctcttcgtg gagccctggg caccctgcac cagctgggca 960
tcgtcgttgg gatccttatt gccagggtgt tcggcctaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020
acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatcccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080
tgcccttctg ccctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140
ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgaggga cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200
tgaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaagg caccatcttg gagctgttcc 1260
gctcaccgcg ctaccgccag cccatcctca tcgccgtggg gctgcagctg tcccagcagc 1320
tgctgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcagggtgtg 1380
agcagcctgt gtatgccacc atcggtcgg gtatcgtcaa cacggccttc actgtgggtg 1440
cgctgttcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcattggg ctggctggca 1500
tggcgggctg tgctgtgctc atgaccatcg cctggccct gctggagcag ctgccctgga 1560
tgtcctatct gagtatcgtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa gtaggccctg 1620
gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tggtcagcca ggggccccga cctgctgctg 1680
ttgctgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtgggcatg tgcttccaat 1740
atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcatcatctt cacgggtgctg ctggtactct 1800
tcttcatctt cacctacttc aaagtctctg agaccaaagg ccggaccttc gatgagatcg 1860
cttccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920
accctctggg ggctgactcc caagtgaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980
cttaattttt catgactgac gtttttctt cattttaatt atcatagtat ttgtttgaaa 2040
aaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tatccttacg attatataaa ttccttacct 2100
aaacctatta tttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160
aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataacat gctctgcat cctttgttca ccgagcaaaa 2220
ttaaaaacgc aaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280
tctctggggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

```

<210> 13

<211> 2338

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 13

```

tcgactctag aggatcccct taagctaatc cttatgaatc cggagaaaag cgggggtcttt 60
taactcaata aaattttccg aaatcctttt tcctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120
gtggctcttc cacctgtttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180
gtttttgcga tggcgaacga gggctggaaa aattaacggg acgccgccta acgatatgaa 240
taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc cattttttat gttttcaaaa 300
cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatcgt tcccggattc acaaatagata taaaaagcga 360
ttacaattct acattctaac cagatttgag atttctctt tctcaattcc tcttatatta 420
gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480
tcagcaagaa ggtgacgggc cgccttatgt tggccgtggg aggggcagtg ctcggatccc 540
tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccca gaaggtaatt gaggagtctt 600
acaatcaaac atggaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccaca ctcaccacac 660
tctggtctct ctccatggcc atcttctctg tcgggggcat gattgggtcc ttctctgtgg 720

```

gcctctttgt taatcgcttt ggcaggcgga actccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780  
 ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtcctttgag atgctgatcc 840  
 tggggccgctt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggctttgtg cccatgtatg 900  
 tgggggaggt gtcaccacaca gctcttcgtg gagccctggg caccctgcac cagctgggca 960  
 tcgtcgttgg gatccttatt gccagggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020  
 acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatcccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080  
 tgccttcttg ccttgagagc ccccgcttcc tgetcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140  
 ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgaggga cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200  
 tgaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatcttg gagctgttcc 1260  
 gctcaccgcg ctaccgccag cccatcctca tcgccgtggt gctgcagctg tcccagcagc 1320  
 tgtcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcagggtgtgc 1380  
 agcagcctgt gtatgccacc atcggtcgg gtatcgtcaa cacggccttc actgtggtgt 1440  
 cgctgttcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcattggt ctggctggca 1500  
 tggcgggctg tgctgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgccctgga 1560  
 tgtcctatct gagtatcgtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa gtaggccctg 1620  
 gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tgttcagcca ggggccccga cctgctgctg 1680  
 ttgctgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtgggcatg tgcttccaat 1740  
 atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcatcatctt cacggtgctg ctggtactct 1800  
 tcttcatctt cacctacttc aaagtccctg agaccaaagg ccggaccttc gatgagatcg 1860  
 cttccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920  
 accctctggg ggctgactcc caagtgtaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980  
 ctttaatttt catgactgac gttttttctt cattttaatt atcatagtat ttgtttgaaa 2040  
 aaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tatccttacg attatataaa ttccttaoct 2100  
 aaacctatta tttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160  
 aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataacat gctctgccat cctttgttca ccgagcaaaa 2220  
 ttaaaaacgc aaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280  
 tctctggggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 2338

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 14

tcgactctag aggatcccct taagctaata cttatgaata cggagaaaaag cggggctctt 60  
 taactcaata aaattttccg aaatcctttt tcctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
 gtggctcttc cacctgtttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180  
 gtttttgca tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgccgccta acgatagtaa 240  
 taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc cattttttat gttttcaaaa 300  
 cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatcgt tcccggattc acaaatgata taaaaagcga 360  
 ttacaattct acattctaac cagatttgag atttccctct tctcaattcc tcttatatta 420  
 gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480  
 tcagcaagaa ggtgacggg cgccttatgt tggcgcgtgg aggggcagtg ctccgatccc 540  
 tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccca gaaggtaatt gaggagtctt 600  
 acaatcaaac atggaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccaca ctccaccac 660  
 tctggctctct ctccgtgatg atcttctctg tcgggggcat gattgggttcc ttctctgtgg 720  
 gcctctttgt taatcgcttt ggcaggcgga actccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780

ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtccctttgag atgctgatcc 840  
 tgggcccgtt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggttttgtg cccatgtatg 900  
 tgggggaggt gtcaccacaca gctcttcgtg gagccctggg caccctgcac cagctgggca 960  
 tcgtcgttgg gatccttatt gccaggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020  
 acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatcccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080  
 tgcccttctg cctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140  
 ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgaggga cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200  
 tgaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaagg caccatcttg gagctgttcc 1260  
 gctcaccgcg ctaccgccag cccatcctca tcgccgtggg gctgcagctg toccagcagc 1320  
 tgtcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcagggtgtg 1380  
 agcagcctgt gtatgccacc atcggtcgg gtatcgtcaa cacggccttc actgtggtgt 1440  
 cgctgttcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcattggg ctggctggca 1500  
 tggcgggctg tgctgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgccctgga 1560  
 tgtcctatct gagtategtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa gtaggacctg 1620  
 gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tgttcagcca ggggccccga cctgctgctg 1680  
 ttgctgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtgggcatg tgcttccaat 1740  
 atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcatcatctt cacgggtgctg ctggtactct 1800  
 tcttcatctt caccacttcc aaagtctctg agaccaaagg ccggaccttc gatgagatcg 1860  
 cttccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920  
 accctctggg ggctgactcc caagtgtaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980  
 cttaattttt catgactgac gttttttctt cattttaatt atcatagtat ttgtttgaaa 2040  
 aaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tatccttacg attatataaa ttccttaacct 2100  
 aaacctatta tttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160  
 aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataacat gctctgccat cctttgttca ccgagcaaaa 2220  
 ttaaaaacgc aaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280  
 tctctggggg gtccctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

<210> 15

<211> 6360

<212> DNA

<213> Vektor

<400> 15

cgtaggaaca atttggggcc cctgcgtggt cttctgaggt tcatctttta catttgcttc 60  
 tgctggataa ttttcagagg caacaaggaa aaattagatg gcaaaaagtc gtctttcaag 120  
 gaaaaatccc caccatcttt cgagatcccc tgtaacttat tggcaactga aagaatgaaa 180  
 aggaggaaaa taaaaaatat actagaactg aaaaaaaaaa agtataaata gagacgatat 240  
 atgccaatac ttcacaatgt tcgaatctat tcttcatttg cagctattgt aaaataataa 300  
 aacatcaaga acaacaagc tcaacttgtc ttttctaaga acaaagaata aacacaaaaa 360  
 caaaaagttt ttttaatttt aatcaaaaag ttaacatgca tcaccatcac catcacacta 420  
 gtggatcccc cgggctgcag gaattcgata tcaagcttat cgataaccgtc gacctcgagt 480  
 catgtaatta gttatgtcac gcttacattc acgcccctcc cccacatccg ctctaaccga 540  
 aaagggaagg gttagacaac ctgaagtcta ggtccctatt tattttttta tagttatggt 600  
 agtattaaga acgttattta tatttcaaatt ttttcttttt tttctgtaca gacgcgtgta 660  
 cgcatgtaac attatactga aaaccttgct tgagaagggt ttgggacgct cgaaggcttt 720  
 aatttgccgc cggtaaccaa ttcgccctat agtgagtcgt attacgcgcg ctactgggcc 780  
 gtcgtttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca 840

gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 900  
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc 960  
 gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc 1020  
 gtccttttcg ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct 1080  
 ctaaactcggg ggctcccttt aggggttcga tttagtgtct tacggcacct cgaccccaaa 1140  
 aaacttgatt aggggtgatggt ttacagtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttctc 1200  
 cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca 1260  
 ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat 1320  
 tgggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg 1380  
 tttacaattt cctgatgcgg tatttttctc ttacgcactc gtgcggtatt tcacaccgca 1440  
 tagggtaata actgatataa ttaaatgaa gctctaattt gtgagtttag tatacatgca 1500  
 tttacttata atacagtttt ttagttttgc tggcgcacac ttctcaaata tgcttcccag 1560  
 cctgcttttc tgtaacgttc accctctacc ttagcatccc ttccctttgc aaatagtcct 1620  
 cttccaacaa taataatgtc agatcctgta gagaccacat catccacggg tctatactgt 1680  
 tgaccaaatg cgtctccctt gtcactataa cccacaccgg gtgtcataat caaccaatcg 1740  
 taaccttcac ctcttccacc catgtctctt tgagcaataa agccgataac aaaatctttg 1800  
 tcgctcttcg caatgtcaac agtaccctta gtatatctc cagtagatag ggagcccttg 1860  
 catgacaatt ctgctaacat caaaaggcct ctaggttccct ttgttacttc ttctgcgcgc 1920  
 tgcttcaaac cgctaacaat acctgggccc accacaccgt gtgcattcgt aatgtctgcc 1980  
 cattctgcta ttctgtatac accgcagag tactgcaatt tgactgtatt accaatgtca 2040  
 gcaaattttc tgtcttcgaa gagtaaaaaa ttgtacttgg cggataatgc ctttagcggc 2100  
 ttaactgtgc cctccatgga aaaatcagtc aagatatcca catgtgtttt tagtaaacaa 2160  
 attttgggac ctaatgcttc aactaactcc agtaattcct tgggtggtacg aacatccaat 2220  
 gaagcacaca agtttggttg cttttcgtgc atgatattaa atagcttggc agcaacagga 2280  
 ctaggatgag tagcagcagc ttcttatat gtacttttcg acatgattta tcttcgtttc 2340  
 ctgcagggtt ttgttctgtg cagttgggtt aagaatactg ggcaatttca tgtttcttca 2400  
 aactacata tgcgtatata taccaatcta agtctgtgct ctttcttcg ttcttcttcc 2460  
 tgttcggaga ttaccgaatc aaaaaaattt caaagaaacc gaaatcaaaa aaaagaataa 2520  
 aaaaaaatg atgaattgaa ttgaaaagct gtggtatggg gcactctcag tacaatctgc 2580  
 tctgatgccg catagttaag ccagccccga cccccgcaa caccgctga cgcgccctga 2640  
 cgggcttgct tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 2700  
 atgtgtcaga ggttttcacc gtcattaccg aaacgcgcga gacgaaaggg cctcgtgata 2760  
 cgcctatttt tatagggttaa tgcattgata ataattggtt cttagtatga tccaatatca 2820  
 aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg aggagtggca gcatatagaa 2880  
 cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccg catggaatgg gataatatca 2940  
 caggaggtag tagactacct ttcatcctac ataaatagac gcatataagt acgcatttaa 3000  
 gcataaacac gcactatgcc gttcttctca tgtatatata tatacaggca acacgcagat 3060  
 atagggtcga cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc gcgttgcat ttcggaagcg 3120  
 ctcgttttcg gaaacgcttt gaagttccta ttccgaagtt cctattctct agaaagtata 3180  
 ggaacttcag agcgcttttg aaaacaaaaa gcgctctgaa gacgcacttt caaaaaacca 3240  
 aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga ataccgcttc cacaacatt 3300  
 gctcaaaaagt atctctttgc tatatatctc tgtgctatat cctatatata cctacccatc 3360  
 cacctttcgc tcttgaaact tgcattctaa ctgcacctct acatttttta tgtttatctc 3420  
 tagtattact ctttagacaa aaaaattgta gtaagaacta ttcataagat gaatcgaaaa 3480  
 caatacgaaa atgtaaacat ttctatacgt tagtatatag agacaaaata gaagaaaccg 3540  
 ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgcctatc actttctggt cacaagtat 3600  
 gcgcaatcca catcgggtata gaataatac ggggatgcct ttatcttgaa aaaatgcacc 3660  
 cgcagcttcg ctagtaatca gtaaaccgcg gaagtggagt caggcttttt ttatggaaga 3720

gaaaatagac accaaagtag ccttcttcta accttaacgg acctacagtg caaaaagtta 3780  
 tcaagagact gcattataga ggcacaaaag gagaaaaaaa gtaatctaag atgctttgtt 3840  
 agaaaaatag cgctctcggg atgcattttt gtagaacaaa aaagaagtat agattctttg 3900  
 ttggtaaaat agcgctctcg cgttgcattt ctgttctgta aaaatgcagc tcagattctt 3960  
 tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgtttt acaaaaatga agcacagatt 4020  
 cttcgttggt aaaatagcgc tttcgcgttg catttctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga 4080  
 ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg ttgcattttt gttctacaaa atgaagcaca 4140  
 gatgcttcgt tcaggtaggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt 4200  
 tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 4260  
 ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt 4320  
 ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggtga aagtaaaaga 4380  
 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggt ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 4440  
 gatccttgag agttttcgcg ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt 4500  
 gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 4560  
 acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 4620  
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgcggc 4680  
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat 4740  
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 4800  
 cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 4860  
 tggcgaaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa 4920  
 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc 4980  
 tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc 5040  
 ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 5100  
 acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta 5160  
 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 5220  
 gatccttttt gataatctca tgaccaaact cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 5280  
 gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat 5340  
 ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga 5400  
 gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 5460  
 ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 5520  
 cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 5580  
 cgggttgag tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg 5640  
 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 5700  
 tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag 5760  
 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct 5820  
 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 5880  
 agggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt 5940  
 ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 6000  
 tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga 6060  
 gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 6120  
 gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 6180  
 caacgcaatt aatgtgagtt acctactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct 6240  
 tccggctcct atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta 6300  
 tgaccatgat tacgccaagc gcgcaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggagct 6360

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 16

ctttctcaat tcctcttata ttag

24

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 17

cccgcacagag aagatcatca cggagagaga ccagag

36

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 18

aacgtcagtc atgaaaaatt aaga

24




BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 2: EBY.18ga /<br>YEph2-rGLUT1 <sup>V69M</sup>  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14026  |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |   |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                              |   |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |   |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |   |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |   |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br><br>Datum: 2001-02-06 |

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 3: EBY.18ga /<br>YEPH2-rGLUT1 <sup>A70M</sup>  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14027   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht.<br/>(Zutreffendes ankreuzen).</p>                          |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>  | <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weils</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p> |


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 1: EBY.18ga  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14031  |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |   |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                                      |   |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |   |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |   |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |   |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br><br>Datum: 2001-02-06 |

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br>Nr. 4: EBY.S7  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14032   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht.<br/>(Zutreffendes ankreuzen).</p>                          |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>  | <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wechs</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p> |


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 5: EBY.S7 /<br>YE <sub>p</sub> 4H7-HsGLUT1   | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14033  |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |   |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                                  |   |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |   |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 <sup>1</sup> (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.  |   |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am . eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |   |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br><br>Datum: 2001-02-06 |

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br>Nr. 6: EBY.VW4000  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14034  |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |   |
| <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht.<br/>(Zutreffendes ankreuzen).</p>                            |   |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |   |
| Diese Internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |   |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |   |
| <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>  | <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br/>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wils</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p> |


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

-----BUDAPESTER-VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| <b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>  |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 7: EBY.f4-1  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14035  |
| <b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>   |   |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                              |   |
| <b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>  |   |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |   |
| <b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>  |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| <b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>   |   |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br><br>Datum: 2001-02-06 |

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br>Nr. 8: EBY.f4-4  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14036   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| <p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht.<br/>(Zutreffendes ankreuzen).</p>                          |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>  | <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weibo</i></p> <p>Datum: 2001-02-06</p> |

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.



BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| <b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>  |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 9: EBY.f4-7  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14037  |
| <b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>   |   |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><div style="margin-left: 40px;"><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung<br/><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</div><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).   |   |
| <b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>  |   |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |   |
| <b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>  |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| <b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>   |   |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><div style="text-align: center; font-family: cursive; font-size: 1.2em;">V. Weib</div><br>Datum: 2001-02-06 |


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br>Nr. 10: EBY.f4-1 /<br>YEp4H7-HsGLUT4.  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14038   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).  |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br><br>Datum: 2001-02-06 |


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
  
D-65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>Nr. 11: EBY.f4-4/YEP4H7-HsGLUT4  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14039   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                              |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br><br>Datum: 2001-02-06 |


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONAL  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Aventis Pharma  
Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br>Nr. 12: EBY.f4-7 /<br>YEp4H7-HsGLUT4   | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 14040   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                                      |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-01-23 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br>Datum: 2001-02-06 |

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/064784 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/12,  
15/81, 1/18, C07K 14/62, C12Q 1/02, 1/54 // (C12N 1/18,  
C12R 1:865)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01373

(22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Februar 2002 (09.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 06 718.6 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND  
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt  
(DE).

(72) Erfinder: MÜLLER, Günter; Im Haindell 1b, 65843  
Sulzbach a. Ts. (DE). KOLLER, Klaus-Peter; Carl-  
Orff-Weg 12, 65812 Bad Soden (DE). BOLES, Eckhard;  
Röntgenweg 5, 40591 Düsseldorf (DE). WIECZORKE,  
Roman; Frankenstrasse 13, 40476 Düsseldorf (DE). DLU-  
GAI, Silke; Burscheiderstr. 40, 40591 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 30. Oktober 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: YEAST STRAIN OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH FUNCTIONAL EXPRESSION OF A GLUT TRANS-  
PORTER

(54) Bezeichnung: HEFESTAMM VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MIT FUNKTIONELLER EXPRESSION EINES  
GLUT-TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention relates to a yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* which, due to deletion of the genomic sequences, does not produce any hexose transporters and which as a consequence cannot propagate on substrates that have hexose as the only carbon source. The capability of the strain of propagating on substrates that have hexose as the only carbon source can be re-established by expression of a GLUT4 gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

WO 02/064784 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int lonal Application No

PCT/EP 02/01373

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/81 C12N1/18 C07K14/62 C12Q1/02  
C12Q1/54 //(C12N1/18, C12R1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
|------------|--|-------------------------|
| X          | WIECZORKE R ET AL: "Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> "<br>FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL,<br>vol. 464, no. 3,<br>31 December 1999 (1999-12-31), pages 123-128, XP004260734<br>ISSN: 0014-5793 | 1-3                     |
| Y          | Seite 127, letzter Abschnitt.<br>Relevant für Erfindungen I & II<br>page 123, right-hand column, paragraph 2<br>--<br>-/-  | 4-11, 14,<br>15, 18, 19 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family.

Date of the actual completion of the international search

28 March 2003

Date of mailing of the international search report

28.04.03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lanzrein. M

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | <p>KRUCKEBERG A L ET AL: "THE HXT2 GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE IS REQUIRED FOR HIGH-AFFINITY GLUCOSE TRANSPORT" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 10, no. 11, 1990, pages 5903-5913, XP009007277<br/> ISSN: 0270-7306<br/> Relevant für Erfindungen I, II<br/> page 5908, right-hand column, paragraph 2</p>  | 1-3                   |
| Y          | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae: Comparison with Glut1 glucose transporter." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1324, no. 1, 1997, pages 111-119, XP001121502<br/> ISSN: 0006-3002<br/> Relevant für Erfindung I<br/> page 114, left-hand column, line 5-8; figure 3</p>   | 4-11                  |
| Y          | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast Saccharomyces cerevisiae." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 315, no. 1, 1996, pages 177-182, XP009002582<br/> ISSN: 0264-6021<br/> Relevant für Erfindung II<br/> page 177, right-hand column; figure 3</p>   | 14,15,<br>18,19       |
| Y          | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Studies on the Glut family transporters: Use of the yeast expression system." MEMBRANE PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION AND EXPRESSION CONTROL., 1997, pages 201-212, XP001121504<br/> International Symposium, Kyushu University Press; S. Karger AG 7-1-146, Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan; P.O. Box, Allschwilerstrasse 10, CH-4009 Basel, Switzerland<br/> ISBN: 3-8055-6465-1<br/> Relevant für Erfindung II<br/> page 201, paragraph 4</p> | 14,15,<br>18,19       |

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No

PCT/EP 02/01373

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | <p>FUKUMOTO H ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR INSULIN-RESPONSIVE GLUCOSE TRANSPORTER EXPRESSED IN HUMAN SKELETAL MUSCLE AND OTHER INSULIN-RESPONSIVE TISSUES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 14, 1989, pages 7776-7779, XP002225835<br/>ISSN: 0021-9258<br/>Relevant für Erfindung I</p>   |                       |
| A          | <p>BIRNBAUM M J ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ENCODING THE RAT BRAIN GLUCOSE-TRANSPORTER PROTEIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 83, 1 August 1986 (1986-08-01), pages 5784-5788, XP002068497<br/>ISSN: 0027-8424<br/>Relevant für Erfindung II</p>                                      |                       |
| A          | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of the rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 44, 30 October 1998 (1998-10-30), pages 29113-29117, XP001121501<br/>ISSN: 0021-9258<br/>Relevant für Erfindung III<br/>page 29114, left-hand column; figure 2; table 1</p> | 20-25                 |
| A          | <p>ASANO T ET AL: "THE ROLE OF N-GLYCOSYLATION OF GLUT1 FOR GLUCOSE TRANSPORT ACTIVITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 36, 1991, pages 24632-24636, XP002236407<br/>ISSN: 0021-9258<br/>Relevant für Erfindung III<br/>table 1</p>   | 20-25                 |



**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 12, 13, 16, 17  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see additional sheet further information from PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplementary sheet

On the basis of the prior review under PCT Rule 40.2(e), no additional fees are to be refunded.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of I.2

Claims: 12, 13, 16, 17

The current Claims 12, 13, 16 and 17 relate to a disproportionately large number of possible compounds or methods that are not supported by the description (PCT Article 6) or that cannot be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

The International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11(entirely)

strain of *Saccharomyces cerevisiae* with suppressed hexose absorption and made to express a GLUT4 gene;  
method that uses said strain for identifying a compound which stimulates or inhibits the activity of the GLUT4 protein.

2. Claims: 14, 15, 18, 19 (entirely)

strain of *Saccharomyces cerevisiae* with suppressed hexose absorption and made to express a GLUT1 gene;  
method that uses said strain for identifying a compound which stimulates or inhibits the activity of the GLUT1 protein.

3. Claims: 20-25

mutants of the GLUT1 protein in which valine is replaced after methionine at position 69 (SEQ ID No: 13) or alanine is replaced after methionine at position 70 (SEQ ID No: 14); polynucleotide sequence encoding said mutants.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/01373

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/81 C12N1/18 C07K14/62 C12Q1/02  
C12Q1/54 //(C12N1/18, C12R1:865)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.      |
|------------|---|-------------------------|
| X          | WIECZORKE R ET AL: "Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in Saccharomyces cerevisiae"<br>FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL,<br>Bd. 464, Nr. 3,<br>31. Dezember 1999 (1999-12-31), Seiten 123-128, XP004260734<br>ISSN: 0014-5793 | 1-3                     |
| Y          | Seite 127, letzter Abschnitt.<br>Relevant für Erfindungen I & II<br>Seite 123, rechte Spalte, Absatz 2<br>---<br>-/-  | 4-11, 14,<br>15, 18, 19 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. März 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28. 04. 03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.

Bevollmächtigter Bediensteter

| Vorfürsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE ÜBERSETZUNGEN |  |                    |
|--|--|--------------------|
| Kategorie*   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | <p>KRUCKEBERG A L ET AL: "THE HXT2 GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE IS REQUIRED FOR HIGH-AFFINITY GLUCOSE TRANSPORT" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 10, Nr. 11, 1990, Seiten 5903-5913, XP009007277<br/>ISSN: 0270-7306<br/>Relevant für Erfindungen I, II<br/>Seite 5908, rechte Spalte, Absatz 2</p>  | 1-3                |
| Y  | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae: Comparison with Glut1 glucose transporter." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1324, Nr. 1, 1997, Seiten 111-119, XP001121502<br/>ISSN: 0006-3002<br/>Relevant für Erfindung I<br/>Seite 114, linke Spalte, Zeile 5-8; Abbildung 3</p>  | 4-11               |
| Y  | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast Saccharomyces cerevisiae." BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 315, Nr. 1, 1996, Seiten 177-182, XP009002582<br/>ISSN: 0264-6021<br/>Relevant für Erfindung II<br/>Seite 177, rechte Spalte; Abbildung 3</p>   | 14,15,<br>18,19    |
| Y  | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Studies on the Glut family transporters: Use of the yeast expression system." MEMBRANE PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION AND EXPRESSION CONTROL., 1997, Seiten 201-212, XP001121504<br/>International Symposium, Kyushu University Press; S. Karger AG 7-1-146, Hakozaeki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan; P.O. Box, Allschwilerstrasse 10, CH-4009 Basel, Switzerland<br/>ISBN: 3-8055-6465-1<br/>Relevant für Erfindung II<br/>Seite 201, Absatz 4</p> | 14,15,<br>18,19    |
|  | -/--   |                    |

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich, unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | <p>FUKUMOTO H ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR INSULIN-RESPONSIVE GLUCOSE TRANSPORTER EXPRESSED IN HUMAN SKELETAL MUSCLE AND OTHER INSULIN-RESPONSIVE TISSUES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 14, 1989, Seiten 7776-7779, XP002225835<br/>ISSN: 0021-9258<br/>Relevant für Erfindung I</p>  |                    |
| A          | <p>BIRNBAUM M J ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ENCODING THE RAT BRAIN GLUCOSE-TRANSPORTER PROTEIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 83, 1. August 1986 (1986-08-01), Seiten 5784-5788, XP002068497<br/>ISSN: 0027-8424<br/>Relevant für Erfindung II</p>  |                    |
| A          | <p>KASAHARA TOSHIKO ET AL: "Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of the rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 44, 30. Oktober 1998 (1998-10-30), Seiten 29113-29117, XP001121501<br/>ISSN: 0021-9258<br/>Relevant für Erfindung III<br/>Seite 29114, linke Spalte; Abbildung 2; Tabelle 1</p> | 20-25              |
| A          | <p>ASANO T ET AL: "THE ROLE OF N-GLYCOSYLATION OF GLUT1 FOR GLUCOSE TRANSPORT ACTIVITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 266, Nr. 36, 1991, Seiten 24632-24636, XP002236407<br/>ISSN: 0021-9258<br/>Relevant für Erfindung III<br/>Tabelle 1</p>  | 20-25              |

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 12, 13, 16, 17  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung  
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 12, 13, 16, 17

Die geltenden Patentansprüche 12, 13, 16, 17 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Verfahren, die sich nicht im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten können. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche unmöglich erscheint.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-11 (komplett)

Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, bei welchem die Aufnahme von Hexosen unterbunden wurde und in dem ein Glut4-Gen zur Expression gebracht wird.

Verfahren unter Verwendung des besagten Stammes zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Aktivität des Glut4 proteins stimuliert oder hemmt.

2. Ansprüche: 14, 15, 18, 19 (komplett)

Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, bei welchem die Aufnahme von Hexosen unterbunden wurde und in dem ein Glut1-Gen zur Expression gebracht wird.

Verfahren unter Verwendung des besagten Stammes zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Aktivität des Glut1 proteins stimuliert oder hemmt.

3. Ansprüche: 20-25

Mutanten des Glut1 proteins, bei welchen Valin nach Methionin and Position 69 (SEQ ID NO 13) oder Alanin nach Methionin and Position 70 (SEQ ID NO 14) ausgetauscht wurde. Polynukleotidsequenz kodierend für besagte Mutanten.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Applicant(s): Müller, et al.  
Serial No.: 10/659,234  
Filing Date: 9/10/2003  
Docket No.: DEAV2002/0065 US NP  
**PRIOR ART**